

# بررسی ویژگی‌های فیزیکی نانوفیتوزم تهیه شده از عصاره غنی از ترکیبات فنلی مرزه خوزستانی به روش خشک کن انجمادی

فائزه فتحی، صمد نژاد ابراهیمی\*

گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران

**چکیده:** فیتوزم فناوری نوین در کپسوله کردن ترکیبات طبیعی به منظور افزایش فراهمی زیستی و جذب ترکیبات مؤثره دارویی و گیاهی در محیط زیستی بدن می‌باشد. ذره‌های فیتوزم به دلیل استفاده از فسفولیپیدها به عنوان پوشش، شرایط جذب بیشینه در بافت‌های هدف را فراهم می‌آورد. هدف از این پژوهش ارائه روش مناسب کپسوله کرده عصاره غنی از مواد پلی فنلی مرزه خوزستانی در ساختار فیتوزوم است. برای کپسوله کردن عصاره در فیتوزم از روش آبدهی لایه نازک و سپس اعمال امواج مافوق صوت و سرانجام خشک کن انجمادی استفاده شد. ساختارهای فیتوزومی ساخته شده از نظر اندازه ذره، ریخت‌شناسی، زمان و مکانیسم رهایش مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های مطالعه حاضر نشان داد که ذره‌های فیتوزومی در ابعاد ۸۲/۲ نانومتر در مدت زمان ۶ ماه پایدار بوده و اندازه ذره‌ها و ریخت‌شناسی در طول ۶ ماه تغییری نکرده است و همچنین ذره‌های فیتوزومی عصاره پلی فنلی مرزه خوزستانی توسط مکانیسم رهایش Korsmeyer تفسیر و توانایی رهاسازی کنترل شده براساس مکانیسم انتشار فیکان (انتقال فاز I) تایید شد.

**کلید واژه ها:** پلی فنلی، مرزه خوزستانی، فیتوزم، خشک کن انجمادی، رهایش دارو.

**KEYWORDS:** Polyphenols, *Satureja khuzistanica*, Phytosome, Freeze dryer, Drug release.

## مقدمه

محیطی، اکسایش، تخریب، pH محافظت می‌کند [۱]. از طرفی این ساختارها باعث افزایش رهایش هوشمندانه در نقطه هدف، افزایش پایداری، کاهش اثرات جانبی و افزایش قابل توجه بازده جذب خواهند بود. به طور کلی ساختار ترکیبات پوششی بایستی خوراکی، ایمن، طبیعی، زیست تخریب‌پذیر با اثر محافظتی بالا بروی مواد فعال زیستی هسته در برابر شرایط محیطی را داشته باشد. همچنین پوشش‌های طبیعی باید توانایی ممانعت از تلفیق بین فاز درونی و بیرونی و حفظ ویژگی‌های عملکردی مواد هسته در طول فرایند و

حامل‌های دارویی و غذایی تکنولوژی نوین به منظور تسریع در دارورسانی هدفمند ترکیبات فعال توسط پوششی مناسب و مستحکم به سلول هدف استفاده می‌شوند. ساختارهای فوق می‌توانند محتویات خود را که غالباً ترکیبات گیاهی، دارویی، غذایی و یا حتی بهداشتی می‌باشند درون خود محبوس و با سرعتی کنترل شده و در شرایط خاص تعریف شده آزاد نمایند. بنابر تعریفی دیگر تکنیک فوق به عنوان یک مانع فیزیکی بین محتویات هسته و حامل / پوشش خارجی عمل می‌کند و از ترکیبات فعال هسته در برابر شرایط نامساعد

\*E-mail: s\_ebrahimi@sbu.ac.ir

\* عهده‌دار مکاتبات

متابولیت‌های ثانویه‌ای که به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شناخته می‌شوند که توانایی مبارزه با بسیاری از آسیب‌های زیست محیطی را دارا می‌باشند.

مرزه خوزستانی با نام علمی *Satureja khuzistanica* Jamzad از تیره نعناعیان منبع غنی از ترکیبات پلی‌فنلی که باعث بهبود و تقویت بدن در برابر بیماری مزمن، بخصوص سرطان‌ها می‌شود. به عنوان ترکیب فعال پرکننده هسته فیتوزم مورد استفاده قرار گرفت. تحقیقات محدودی بر روی مرزه خوزستانی انجام گرفته است، پتانسیل دارویی قابل توجه این گیاه در بسیاری از حیطه‌های سلامت و پوست به اثبات رسیده است. این گیاه دارویی دارای ویژگی‌های ضد باکتری، ضد تومور، ضد التهاب، ضد هیپاتیت، ضد عفونی، سم زدای قوی کبد و آنتی‌اکسیدان قوی می‌باشد [۱۲]، [۱۳]. همچنین به طور گسترده در داروهای ضد دیابت، هیپوگلیسمی، ضد انعقاد خون، ضد عفونی، ضد التهاب، ضد انگل و هماتولوژی استفاده می‌شود [۱۴]–[۱۶]. در این پژوهش از مرزه خوزستانی به عنوان منبع غنی از ترکیبات پلی‌فنلی در پوششی از جنس فیتوزم استفاده شد. فیتوزم ساخته شده حاوی عصاره پلی‌فنلی مرزه خوزستانی به افزایش پایداری و رهایش کنترل شده مواد مؤثره در طول زمان و همچنین افزایش زیست‌فراهمی مواد در محیط زیستی بدن، جذب موثر و افزایش پتانسیل زمان نگهداری کمک بسزایی دارد.

### بخش تجربی

#### مواد و دستگاه‌ها

استاندارد رزمارینیک اسید تهیه شده از شرکت Phytopurify کشور چین خریداری شد. لیسیترین سویا تهیه شده از شرکت Across بود. اتانول و دی‌کلرومتان از شرکت امرتات، تهران تهیه گردید. رزین Diaion HP-20 از شرکت Diaion ساخت کشور ایتالیا و آب مقطر به وسیله دستگاه Millipore تهیه شد. هموژنایزر التراسونیک ۱۶۰۰ وات مدل UH۲۰-۱۶۰۰ ساخته شده توسط شرکت تولیدی بهین تامین اهورا، وزنه الکترونیک Mettler Toledo AG245 ساخته شده توسط شرکت Columbus, OH, USA، تبخیرکننده‌ی دوار (روتاری اوپوریتور) ساخته شده توسط شرکت Heidolph کشور آلمان مورد استفاده قرار گرفت.

#### گیاه‌شناسی و آماده‌سازی

اندام هوایی مرزه خوزستانی از شرکت داروسازی گیاهی وشا دارو پارس به صورت هدیه در اختیار قرار گرفت. و فرآیند خشک

زمان نگهداری را داشته باشد. از ویژگی‌های بسیار مهم در انتخاب حامل می‌توان به پتانسیل بالای محدودکنندگی، نوع رهاسازی، پایداری مورد نیاز و میزان فشار تحمیلی اشاره کرد. در نتیجه با در نظر گرفتن ویژگی‌های ماده فعال (هسته درونی)، تکنیک و روش مورد استفاده در کپسوله کردن، حامل نهایی در میکروکپسول انتخاب می‌شود [۲]، [۳]. به طور کلی ترکیبات حامل/پوشش را پلیمرهای طبیعی مانند کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند.

فیتوزم فناوری نوین به منظور بارگذاری مواد مؤثره یا عصاره فعال درون کپسولی از فسفولیپید می‌باشد. در تکنیک فیتوزم ترکیبات با خاصیت آب‌دوست از طریق پیوند هیدروژنی با فسفولیپیدهای خاصی لینک شده و با به وجود آوردن شرایط بینابینی دو سر آب‌دوست و چربی‌دوست به فراهمی زیستی و جذب ترکیبات مؤثره گیاهی در محیط بیولوژیکی کمک می‌کند. فیتوزم تکنولوژی نوین و کاربردی به منظور تثبیت و حفاظت از ترکیبات حساس است. حصول اطمینان از حفظ طعم، بوی مواد مغذی، تبدیل مایع به جامد جهت جابجایی آسان‌تر، رهاسازی هدفمند ترکیبات فعال توسط پوشینه‌های خوراکی و غیرسمی بدون هیچ‌گونه ضرر زیست محیطی جهت حذف مکانیزم‌های غیرمعمول و زمان فرمولاسیون می‌باشد. این روش به وفور در صنایع گوناگون غذایی، دارویی و آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. فیتوزم حلالیت را در فاز چربی‌دوست بالا برده و از این طریق به پایداری و جذب‌زیستی ترکیبات مؤثره گیاهی کمک می‌کند. در تکنولوژی فیتوزم ترکیبات فعال گیاهی از طریق پیوند شبه‌هیدروژنی به فسفولیپید متصل می‌شود. در این ساختارها با افزایش ظرفیت حلالیت ترکیبات مؤثره گیاهی به عبور این ترکیبات از غشای سلولی و وارد شدن به چرخه سلولی خونی کمک می‌کند. تکنیک فوق نسبت ساده استوکیومتری کمپلکس بینابین ترکیبات طبیعی (فلاونوئیدها) و فسفولیپید در حلال غیر قطبی می‌باشد که از برهمکنش پیوندهای هیدروژنی سر قطبی فسفولیپیدها و سر قطبی ترکیبات طبیعی منجر به تولید محصول چربی‌دوست با نقطه ذوب مشخص و حلالیت خوب در حلال‌های غیرقطبی می‌شود [۴]–[۱۰]. فرایند فیتوزم از سه مرحله اساسی پیروی می‌کند: تشکیل دیواره و یا لایه محافظ اطراف مواد هسته، تشکیل پیوند شبه کوالانسی، نگهداری مواد مؤثره درون پوسته خارجی به طوریکه تحت شرایط خاص این ترکیبات از لایه بیرونی خارج نشده و همچنین ترکیبات تشکیل دهنده در برابر شرایط ناخواسته شده و در نهایت رهاسازی ترکیبات درون هسته در زمان معین، شرایط خاص و به نسبت کنترل شده می‌باشد [۱۱]. پلی‌فنل‌ها

کردن در سایه و به دور از تابش مستقیم آفتاب به مدت یک هفته به طول انجامید. گیاه خشک شده توسط آسیاب پودر و در شرایط مساعد در دمای اتاق نگهداری شد.

### عصاره گیری و غنی‌سازی ترکیبات پلی‌فنلی

مقدار ۵۰۰ گرم از گیاه مرزه خوزستانی با استفاده از ۳ لیتر حلال هیدروالکی به نسبت آب: اتانول (۷۰:۳۰) به روش خیساندن بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۵ روز در سه تکرار به صورتی که در هر مرحله حلال فیلتر شده جدا شد و حلال تازه به تفاله گیاه اضافه شد. سپس حلال حاوی عصاره گیاه پس از ۳ بار جمع‌آوری تحت شرایط خلاء و دمای ۴۰ °C توسط دستگاه تبخیرکننده‌ی دوار تبخیر و عصاره حاصل در یخچال در دمای ۴-۲ °C نگهداری شد. پس از اتمام مراحل عصاره‌گیری، بازده عصاره‌گیری بر اساس وزن خشک گیاه اولیه و وزن خشک عصاره به‌دست آمده محاسبه شد.

فرآیند غنی‌سازی ترکیبات پلی‌فنلی توسط رزین Diaion HP-20 انجام شد. رزین Diaion HP-20 از جنس کopolymer استایرن دی‌ونیل‌بنزن به صورت کروی با قطر ۰/۵ میلی‌متر به عنوان یکی از موثرترین جاذب‌های آروماتیک صنعتی پلیمری - مصنوعی به طور گسترده در تصفیه محصولات دارویی و عصاره‌های طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۷]، [۱۸]. رزین Diaion HP-20 از یکروز قبل توسط اتانول به مدت ۱۲ ساعت فعال شد. پس از فعال شدن رزین ستون رزین از حلال خالی و با آب مقطر گاز زدایی شده سه تا چهار بار شسته تا ستون عاری از هرگونه حلال آلی باشد. پس از شستشوی ستون رزین، مقدار ۱۲۴ گرم عصاره گیاهی غلیظ شده در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و بعد از صاف نمودن به آرامی با سرعت جریان ۵ میلی‌لیتر بر دقیقه به ستون حاوی رزین بارگذاری گردید. ترکیبات پلی‌فنلی موجود در عصاره تام بر روی سطح رزین جذب شده و بقیه مواد موجود در عصاره مانند ترکیبات قندی و غیر ضروری بدون برهمکنش به کمک فاز آبی شسته شده و دور ریخته می‌شود. در ادامه بعد از فاز آبی ستون رزین شسته شده و ترکیبات بارگذاری شده بر روی سطح رزین توسط حلال اتانول با نظر گرفتن تمایل ترکیبات قطبی به حلال قطبی در مقایسه با تمایل به رزین واجذب می‌شوند. در این حالت محلول زرد متمایل به قهوه‌ای که حاوی مواد پلی‌فنلی غنی شده موجود در عصاره به‌دست آمد. بازده براساس نسبت گرم عصاره تام بارگذاری شده بر روی سطح رزین و گرم عصاره غنی از ترکیبات پلی‌فنلی محاسبه و گزارش گردید.

### آنالیز عصاره پلی‌فنلی مرزه خوزستانی توسط دستگاه HPLC

آنالیز کلیه مراحل بهینه‌سازی و تغلیظ‌سازی عصاره پلی‌فنلی مرزه خوزستانی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ساخت شرکت Waters مجهز شده به 2695 Separations Module (USA) و اتوسمپلر با لوپ تزریق ۱۰۰ میکرولیتری و تشخیص دهنده Photodiode Array Detectors (PDA) و ستون کروماتوگرافی Sunfire ساخت شرکت Waters با مشخصات  $3.5 \mu\text{m} \times 3.0 \times 150.0 \text{ mm}$  C18 انجام شد. آنالیز در مدت زمان ۵۵ دقیقه، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود. طول موج ۳۳۰ نانومتر به منظور پایش پروفایل فیتوشیمیایی انتخاب شد. متانول (A) و آب (B) به همراه ۰/۲ درصد TFA به عنوان فاز متحرک انتخاب شد. حلال (A) در زمان ۰-۱۰ دقیقه از ۲۰٪ به ۳-٪، از ۱۰-۳۰ دقیقه از ۳۰٪ به ۶۰٪، از ۴۰-۴۵ دقیقه از ۶۰٪ به ۸۰٪، از ۴۵-۴۵ دقیقه از ۸۰٪ به ۱۰۰٪ و سرانجام از ۴۵-۴۵ دقیقه ثابت ۱۰۰٪. سرانجام آب به عنوان حلال عصاره به منظور آنالیز HPLC استفاده شد. طول موج تشخیص در ناحیه ۳۳۰ نانومتر قرار داده شد.

### آنالیز LC-MS عصاره مرزه خوزستانی

طیف جرمی به کمک اسپکترومتر جرمی (Esquire 3000) متصل به منفذ یونیزاسیون (Electrospray) ساخت شرکت (Bruker Daltonic, Bremen, Germany) و متصل به سیستم کروماتوگرافی مایع (Agilent, Waldbronn Germany) دارای پمپ چهارتایی متصل به دستگاه گاز زدا و آشکارساز فوتو دیود و اتوسمپلر به دست آمد. شرایط شوی و ستون کروماتوگرافی استفاده شده شبیه بخش بالا بود.

### ساخت ذره‌های فیتوزومی

عصاره غنی از مواد پلی‌فنلی مرزه خوزستانی به منظور تهیه ساختار فیتوزوم استفاده شد. ساختار فیتوزوم با روش تشکیل لایه نازک و امواج مافوق صوت با شدت بالا ساخته و توسط خشک کن انجمادی خشک و پودر شد. نسبت مولی ۱:۱ لسیترین نسبت به ماده مؤثره به عنوان نسبت بهینه انتخاب شد. ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره پلی‌فنلی از مرزه به همراه ۸ میلی‌لیتر اتانول به فلاسک ۲۰ میلی‌لیتری بر روی همزن مغناطیسی در ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا محلول کامل شفاف حاصل شود. ۱۰۰ میلی‌گرم لسیترین به ۲ میلی‌لیتر دی کلرو متان اضافه شد و توسط ورتکس با سرعت و شتاب بالا تا رسیدن به محلول شفاف زرد رنگ تکان داده شد. پس از اطمینان

دهنده و شرایط رهایش به طور مستقیم بر روی نحوه رهایش دارو و سلول هدف تاثیر گذار می‌باشد. بدین منظور منحنی کالیبراسیون استاندارد به منظور تعریف بازه آنالیز، اندازه‌گیری و تعریف شده است.

### مدل‌های ریاضی رهایش مواد فعال

از مکانیسم‌های رهایش معمول می‌توان به انتشار، تجزیه زیستی، گسترش (ژل شدگی-اماس) و اسمز نام برد. مدل‌های ریاضی متنوعی به منظور تعریف رهایش ترکیبات فعال وجود دارد که می‌توان به سه گروه اصلی دسته بندی کرد:

مدل‌های آماری: شامل تجزیه و تحلیل داده‌ها تجربی، طرح‌های تکرار و روش‌های چند متغیره مثل: MNOVA، تحلیل واریانس چند متغیره

مدل‌های وابسته: شامل متغیر مرتبه صفر، متغیر مرتبه یک و مدل‌های Hixson-Crowell, Peppas Korsmeyer, Higuchi، Baker-Lonsdale Weibull model می‌باشد.

مدل‌های غیر وابسته: شامل فاکتورهای متفاوت (f1) فاکتورهای مشابه (f2) می‌باشد.

مدل‌های وابسته یکی از انواع مدل‌های ریاضی که کاربرد گسترده در تعریف مکانیسم‌های رهایش دارد. سیستم رهایش دارو ایده‌آل از مدل‌های وابسته متغیر مرتبه صفر، یک و میانه تبعیت می‌کند. مدل وابسته مرتبه صفر (نرخ رهایش ثابت) معمولاً زمانی اتفاق می‌افتد که ترکیب فعال هسته خالص باشد یعنی رهایش ترکیب فعال براساس ماده فعال خالص می‌باشد. فرمول (۱) مدل وابسته مرتبه میانه، زمانی اتفاق می‌افتد که ترکیبات تشکیل دهنده هسته ماتریکس باشند. مدل وابسته مرتبه یک برای ترکیبات فعالی که حالت محلول (مایع یا در محیط مایع قرار دارند اتفاق می‌افتد. فرمول (۲) در حقیقت مکانیسم رهایش ترکیبات فعال می‌تواند به طور کامل نسبت به مدل‌های غیروابسته مرتبه صفر، میانه و یک متفاوت باشد. بنابراین مدل‌های ریاضیاتی بسیاری به منظور تعریف سیستم‌های فوق وجود دارد به عنوان مثال: فرمول (۳) Higuchi، فرمول (۴) Korsmeyer-Peppas، فرمول (۵) Weibull. سه مدل فوق به طور معمول به منظور تعریف مکانیسم رهایش بسیاری از ترکیبات فعال در خصوص دارورسانی هدفمند استفاده می‌شود. سینتیک متغیر غیر وابسته مرتبه صفر (با نرخ رهایش ثابت) بر مبنای رهایش‌های آهسته ترکیبات فعال از پوشش خارجی می‌باشند. ضریب همبستگی (R2) به دست آمده از فرمول مرتبه صفر بایستی در محدوده ۰/۸۸۹ - ۰/۸۹۶ باشد. همچنین براساس پارامتر n

از محلولیت هر دو ترکیب در مقدار کافی از حلال، محلول لسیترین و دی کلرومتان به محلول عصاره در اتانول در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد اضافه شد. و به مدت ۲ ساعت بر روی همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد رفلاکس شد. تا مدت زمان کافی به منظور تشکیل پیوند بین سرقطبی ترکیبات پلی‌فنلی و سر قطبی فسفاتیدیل کولین تشکیل شود. محلول نهایی توسط تبخیر کننده دوار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با سرعت متوسط و افزایش rpm از ۱۷۰-۴۰ (دور بر دقیقه) خشک شده و سرانجام به منظور اطمینان از عدم وجود رطوبت در لایه نازک تشکیل شده گاز نیتروژن خشی به مدت ۵ دقیقه بر روی نمونه دمیده شد. لایه نازک در دسیکاتور به دور از رطوبت در مدت زمان ۲۴ ساعت نگهداری شد. آبدهی توسط بافر با pH=۷/۵ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه انجام شد [۱۰]، [۱۹]، [۲۰]. پس از اتمام آبدهی سونیکیشن بر روی هر نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با قدرت ۶۰ درصد دستگاه مافوق صوت انجام شد. ذره‌های فیتوزمی تشکیل شده توسط خشک کن انجمادی پودر شده و به منظور آنالیزهای بعدی در یخچال با دمای ۲-۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

### اندازه‌گیری و ریخت‌شناسی ذره‌ها

به منظور تعیین سایز ذره‌های کپسوله شده در ساختار فیتوزم از دستگاه تفرق نور پویا مدل (Nanophox Sympatec GmbH) استفاده شد. بدین منظور کپسول‌های ساخته شده بلافاصله بعد از تشکیل در محلول بافری اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی ویژگی‌های ظاهری کپسول‌های ساخته شده از روش تصویر برداری SEM استفاده شد. بدین منظور کپسول‌های ساخته شده به کمک چسب کربن روی سطح نگه دارنده ثابت و بوسیله طلا پیش از تصویربرداری پوشش‌دهی شدند و سرانجام با دستگاه JSM-6380, JEOL, Tokyo, Japan با بزرگنمایی ۱۰۰۰x و ۲۰۰kx مورد آنالیز قرار گرفتند.

### بررسی رهایش عصاره

رهایش ترکیبات فعال بر اساس استاندارد تعریف شده در بازه معنی دار منحنی کالیبراسیون بررسی شد. رهایش عصاره از درون ساختار فیتوزمی از زمان صفر و در فواصل زمانی ۲۵ ثانیه در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی در بازه زمانی ۰-۱۰ دقیقه توسط دستگاه UV-Visible ثبت و گزارش شد. رهایش طراحی مدرن به طور دقیق و هوشمند زمان و چگونگی انتشار و آزاد سازی ترکیبات فعال را برنامه ریزی و تعریف می‌کند. نوع حامل و عامل پوشش

## نتیجه‌ها

### تجزیه مواد فیتوشیمیایی گیاه

آنالیز عصاره تام و پلی‌فنلی براساس مقدار رزمارینیک اسید استاندارد سازی و میزان تغییرات این ماده در مراحل گوناگون آماده سازی عصاره مورد پایش قرار گرفت. اندازه‌گیری مقدار رزمارینیک اسید در عصاره به کمک دستگاه HPLC مورد آنالیز قرار گرفت. بر اساس کروماتوگرام‌های ارایه شده در شکل ۳-۱ الگوی کلی دو عصاره تام و بعد از آماده سازی توسط رزین شباهت خوبی دارد. غنی سازی عصاره تام براساس ترکیبات پلی‌فنلی تغییر محسوسی در کروماتوگرام ترکیبات اصلی عصاره مرزه خوزستانی ایجاد نکرده و فقط شدت پیک‌ها نسبت به قبل از شرایط بارگذاری بر روی ستون بیشتر شده‌است که این نشان دهنده حذف ترکیبات قندی و ترکیبات شیمیایی غیر ضروری در عصاره می‌باشد. از طرفی افزایش شدت پیک استاندارد نشان دهنده افزایش محسوس غلظت ترکیبات پلی‌فنلی می‌باشد. جدول شماره ۳-۱ تغییرات در عصاره مرزه خوزستانی قبل و بعد از بارگذاری بر روی رزین را نشان می‌دهد. ماده شاخص موجود در عصاره مرزه خوزستانی ترکیب رزمارینیک اسید می‌باشد که وجود این ماده به روش مقایسه با استاندارد و ثبت طیف جرمی به کمک دستگاه LC-MS ثابت شد (شکل ۳-۲) طیف ماورای بنفش این ترکیب و جرم ملکولی ۳۵۹ که نشانگر یونیزاسیون این ماده در حالت منفی و کنده شدن یک پروتون از ساختار ( [M-H] ) هست. بازده عصاره‌گیری از گیاه خشک مرزه خوزستانی ۲۰/۷۴٪ گزارش شد. همچنین بازده غنی سازی عصاره تام مرزه خوزستانی بر مبنای گرم عصاره پلی‌فنلی نسبت به گیاه خشک ۳۳/۱٪ گزارش شد. منحنی کالیبراسیون رزمارینیک اسید در بازه ۲۵ - ۲۰۰ ppm آنالیز و شیب منحنی  $y = ۱۶۳۰۴۰ - ۵۸۷۳۰۲x$  گزارش شد. بر این اساس سطح زیر پیک استاندارد غلظت رزمارینیک اسید قبل و بعد از بارگذاری بر روی رزین به ترتیب ۳۷/۳۳ و ۶۳/۹۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد که نشان دهنده افزایش ترکیبات پلی‌فنلی معادل ۱/۷۱ برابری نسبت به عصاره تام مرزه خوزستانی می‌باشد. جدول شماره ۱ مراحل گوناگون عصاره‌گیری و غنی‌سازی ترکیبات پلی‌فنلی را شرح می‌دهد.

### بازده فیتوزم

بازده ساختار فیتوزم ساخته شده توسط مرزه خوزستانی بر مبنای مواد اولیه تشکیل دهنده اعم از عصاره پلی‌فنلی، لستین و نمک استفاده شده در بافر فسفات نسبت به میلی‌گرم محصول نهایی محاسبه شد. جدول شماره ۲ به طور کامل میزان دقیق اجزا تشکیل دهنده و بازده ساخت ذره‌های فیتوزم را نمایش می‌دهد.

می‌توان مکانیسم رهایش ترکیب فعال براساس دسته بندی زیر پیش بینی کرد:

کوچکتر از ۰/۴۳: مکانیزم انتقال ترکیبات فعال (رهایش) براساس انتشار فیکان (انتقال فاز I) پیش بینی می‌شود و شتاب رهایش از رابطه  $t^{0.57}$  تبعیت می‌کند.

n در محدوده ۰/۴۳ - ۰/۸۵ مکانیزم انتقال ترکیبات فعال (رهایش) بر اساس انتشار نامنظم (غیرعادی) که ترکیبی از انتشار و تورم پیش بینی می‌شود. شتاب رهایش از رابطه  $t^{n-1}$  تبعیت می‌کند. n برابر ۰/۸۵ مکانیزم انتقال ترکیبات فعال (رهایش) بر اساس انتقال فاز II پیش بینی می‌شود. این نوع انتشار بر اساس ترکیبی از انتشار، ژل‌شدگی و آماس اتفاق می‌افتد و به صورت مستقیم از مکانیسم رهایش مرتبه صفر تبعیت می‌کند.

n بزرگتر از ۰/۸۵ مکانیزم انتقال ترکیبات فعال (رهایش) براساس انتقال مافوق فاز II تبعیت می‌کند و شتاب رهایش از رابطه  $t^{n-1}$  تبعیت می‌کند.

$$\begin{array}{l} (۱) \quad Q_t = Q_0 + K_0 t \\ (۲) \quad Q_t = Q_0 e^{-K_1 t} \\ (۳) \quad Q_t = KH \sqrt{t} \\ (۴) \quad Q_t = KH \sqrt{t} \\ (۵) \quad M_t = M_\infty \left[ 1 - e^{-\left(\frac{t-t_0}{\tau d}\right)^\beta} \right] \end{array}$$

$Q_t$ : مقدار تجمع ماده فعال آزاد شده در زمان t

$Q_0$ : مقدار اولیه ترکیب فعال در محلول ( $Q_0 = 0$ )

$K_0$ : میزان انتشار صفر ثابت

$K_1$ : ثابت مرتبه یک رهایش

$Q_t$ : مقدار آزاد شده از ترکیب فعال در زمان t.

$K_0$ : ثابت مرتبه صفر رهایش و  $K_1$  ثابت مرتبه یک رهایش.

$K_H$ : ثابت انحلال Higuchi.

$Q_t/Q_\infty$ : بخشی از ترکیبات فعال که در زمان t آزاد شده‌اند.

$K_k$ : ثابت Korsmeyer-Peppas شامل خصوصیات ساختاری، فرم هندسی

(میکروکپسول، نانو کپسول، فیلم، سیلندر ویا قرص) می‌باشد.

n: نماینده افقی (پارامتری که نوع مکانیسم رهایش را تعریف میکند).

$M_t$ : میزان رهایش در زمان t بر حسب دقیقه.

$M_\infty$ : درصد رهایش در زمان بی نهایت،

$t_0$ : رهایش ترکیب فعال در زمان صفر که معمولاً  $t_0=0$  می‌باشد.

$\beta$ : پارامتر شکل منحنی.

$\tau$ : زمان بر حسب دقیقه زمانی که ۲٪ از ترکیبات فعال شده باشند [۲۱]، [۲۲].

جدول ۱: بازده مراحل گوناگون عصاره‌های مورد مطالعه و عصاره پلی‌فنلی مستخرج از رزین Diaion HP-20

دسته بندی گیاه		مقدار عصاره		بازده بر اساس میزان ماده خشک عصاره (%)	
نام	گیاه خشک (g)	قبل از رزین (g)	بعد از رزین (g)	عصاره تام (%)	عصاره غنی از مواد پلی‌فنلی (%)
مرزه خوزستانی (SKH)	۵۹۶/۴۸	۱۲۳/۷۲	۴۱/۲۱	۲۰/۷۴	۳۳/۱

جدول ۲: بازده ساخت ذره‌های فیتوزومی با استفاده از لسیتین و عصاره غنی از مواد پلی‌فنلی

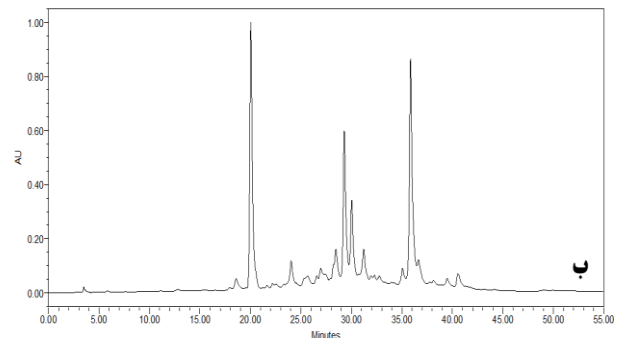
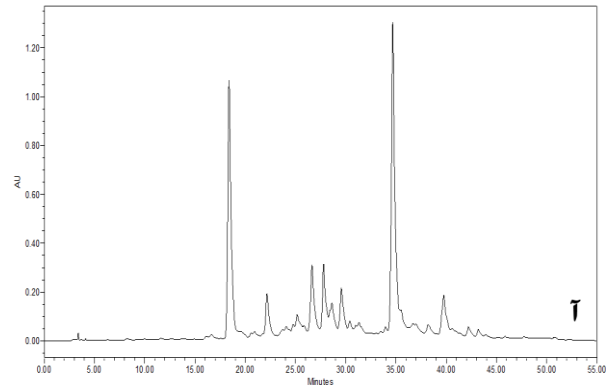
بازده (%)	میزان خوراک خروجی	میزان خوراک ورودی			کد محصول	نمونه
		عصاره	لسیتین	نمک بافر		
۵۷/۶	۸۶۷/۷	۱۰۰	۱۰۰	۳۰۰	PFSKH	فیتوزوم عصاره پلی‌فنلی مرزه خوزستانی

### بررسی اندازه ذره‌های کپسوله شده

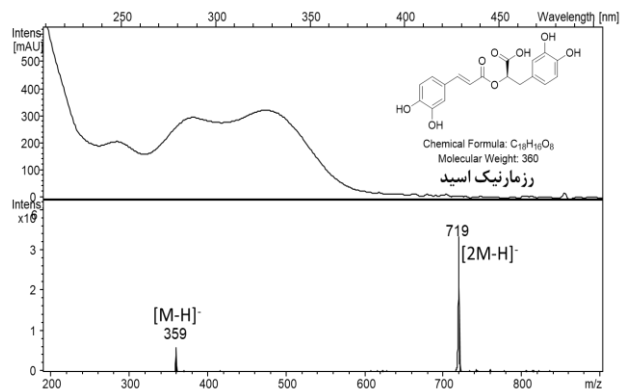
نانوذره‌های فیتوزومی به روش آبدی لایه نازک با استفاده از تکنیک امواج مافوق صوت با شدت بالا ساخته و توسط خشک‌کن انجمادی خشک و پودر شد. نسبت مولی لسیتین به ماده مؤثره ۱:۱ به عنوان نسبت بهینه و موثر در کلیه نمونه‌ها انتخاب شد. میانگین اندازه ذره موثر فیتوزوم ۸۲/۲ اندازه گیری و گزارش شد. همچنین پس از گذشت مدت زمان ۶ ماه اندازه ذره موثر فیتوزوم ساخته شده میانگین اندازه ذره‌ها ۱۰۲/۹ نانومتر مشاهده شد. با توجه به اندازه ذره‌های فیتوزوم مستقیماً بعد از ساخت و پس از گذشت ۶ ماه از ساخت تغییر محسوسی در اندازه ذره مشاهده نشد، در نتیجه شرایط فوق را می‌توان گواهی بر پایداری ذره‌های فیتوزومی پس از ۶ ماه دانست (شکل ۳).

### تصاویر SEM ذره‌های فیتوزومی

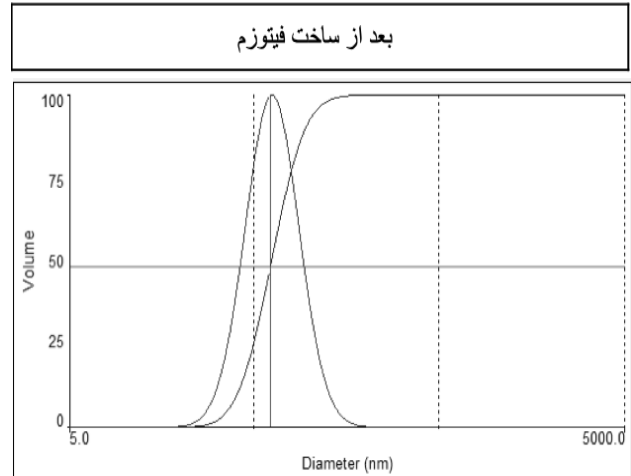
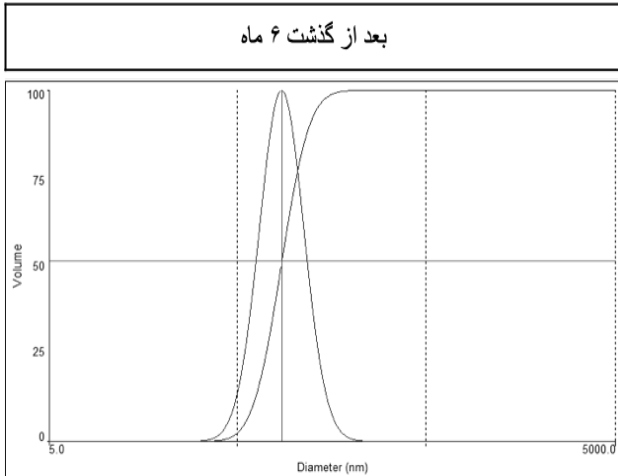
ریخت‌شناسی ذره‌های تشکیل شده فیتوزومی توسط دستگاه JSM-6380, JEOL انجام شد. در شکل ۴ ریخت‌شناسی ذره‌های فیتوزوم ساخته شده در بزرگنمایی ۱۰۰۰x و ۲۰۰kx نشان داده شده است. همانطور که در تصاویر SEM به وضوح لایه ای از نمک کریستاله شده باقیمانده از محلول بافری بر روی سطح ذره‌های فیتوزوم دیده می‌شود. در روش آماده سازی توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی به دلیل فقدان شرایط حذف نمک کریستاله شده از بافر فسفات و سرانجام رسوب دهی نمک موجود در بافر فسفات بر روی ذره‌های فیتوزوم، تصاویر ذره‌ها به صورت واضح و کپسوله قابل رویت و شناسایی از نظر اندازه ذره نمی‌باشد، با این حال وجود ذره‌های کروی فیتوزوم در زیر رسوب نمک قابل ارزیابی و شناسایی است. با این وجود اندازه ذره‌ها توسط دستگاه Nanophox Sympatec GmbH اندازه گیری و گزارش شده‌است.



شکل ۱: کروماتوگرام عصاره غنی شده از ترکیبات پلی‌فنلی مرزه خوزستانی قبل (ا) و بعد از بارگذاری بر روی رزین (ب)



شکل ۲: ساختار ترکیب رزمارینیک اسید، طیف ماورابنفش ثبت شده و طیف جرمی آن در حالت پلاریزاسیون منفی



اندازه ذرات بر مبنای حجمی بر حسب نانومتر		کد محصول
Kcps	میانگین اندازه ذره موثر	
۴۸۵/۴	۱۰۲/۹	PFSKH

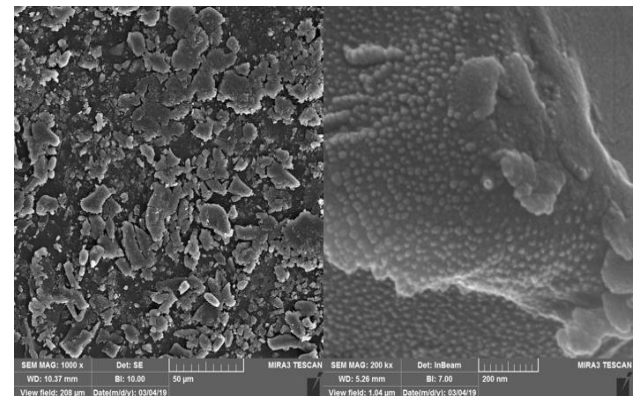
اندازه ذرات بر مبنای حجمی بر حسب نانومتر		کد محصول
Kcps	میانگین اندازه ذره موثر	
۴۵۵/۷	۸۲/۲	PFSKH

شکل ۳: منحنی و اندازه ذره‌های تشکیل شده فیتوزم حاوی عصاره غنی شده از ترکیبات پلی فنلی مرزه خوزستانی

رهایش ثابت) بر مبنای رهایش آهسته ترکیبات فعال از پوشش فسفولیپیدی محاسبه شد (شکل ۵). ضریب همبستگی ( $R_2$ ) به دست آمده از فرمول مرتبه صفر بایستی در محدوده  $0/889 - 0/986$  معنی دار باشد در این حالت با استفاده از مدل Korsmeyer تعریف و مکانیسم رهایش کپسول‌ها از طریق عدد  $n$  بررسی و آنالیز می‌شود. بدین طریق براساس شکل ۵ شیب منحنی منطقه رهایش براساس تنظیم نرم افزار Excel در حالت power با پیروی از مدل Korsmeyer فرمول متناسب را ارایه می‌دهد. بررسی پارامتر  $n$  در مدل Korsmeyer نوع مکانیسم رهایش را تعریف می‌کند. و شتاب رهایش از رابطه  $t^{-0.57}$  تبعیت می‌کند. در نتیجه ضریب همبستگی معادل  $0/9906$  محاسبه و پارامتر  $n$  معادل  $0/3535$  گزارش شد. بر این مبنای پارامتر  $n$  کوچکتر از  $0/43$  در نتیجه رهایش ساختار فیتوزم از مکانیسم رهایش از انتشار فیکان (انتقال فاز I) تعریف می‌شود.

### بحث

ترکیبات طبیعی به دلیل اثرات درمانی متنوع نقش بسزایی در سلامت انسان ایفا می‌کنند. از این میان ترکیبات پلی فنلی با منشأ طبیعی به طور گسترده به عنوان منبع غذایی و دارویی در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های از جمله سرطان استفاده می‌شوند.

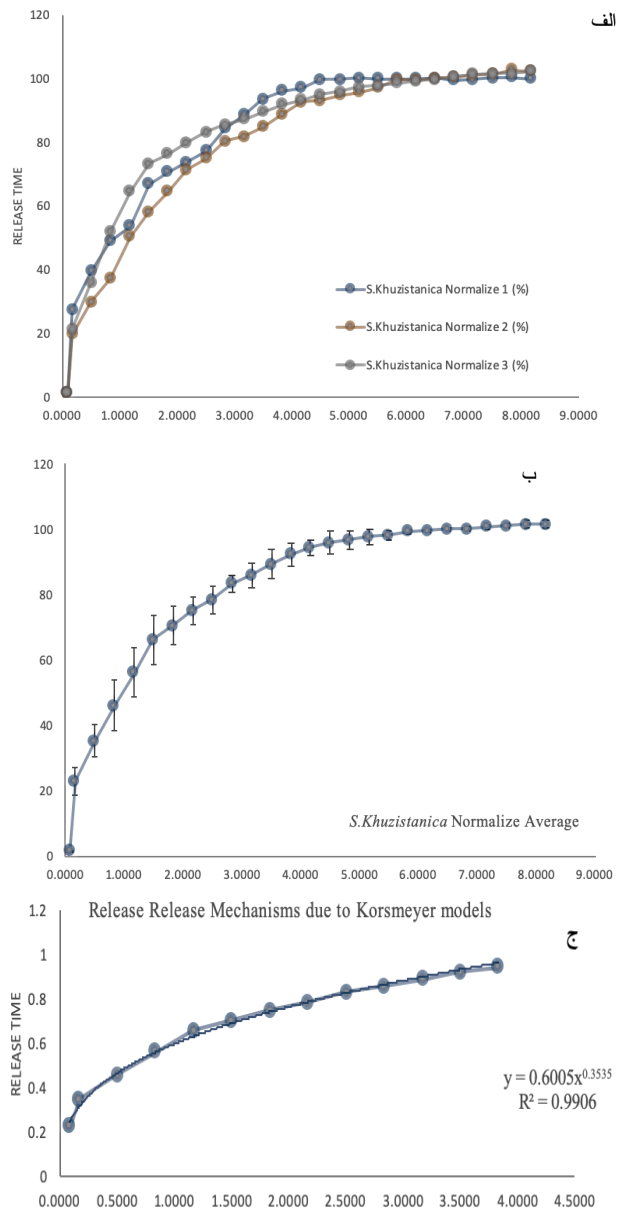


شکل ۴: ریخت‌شناسی ذره‌های تشکیل شده فیتوزم حاوی عصاره غنی شده از ترکیبات پلی فنلی مرزه خوزستانی

### بررسی رهایش

زمان رهایش ذره‌های تشکیل شده فیتوزم حاوی عصاره غنی شده مرزه خوزستانی (انتقال ترکیبات فعال از پوشش فسفولیپیدی به محیط خارج)  $4/833$  دقیقه گزارش شد. زمان رهایش ذره‌های تشکیل شده فیتوزم حاوی عصاره غنی شده پلی فنلی مرزه با سه تکرار در فواصل زمانی ۲۵ ثانیه در مدت زمان ۱۰ دقیقه ثبت شد. سپس از داده‌های عددی میانگین گرفته شد. و نمودار میانگین رها سازی عصاره پلی فنلی مرزه خوزستانی رسم و مکانیسم رهایش براساس سینتیک متغیرغیروابسته مرتبه صفر (با نرخ

مانند رزمارینیک اسید و انواع فلاونوئیدی از عصاره مرزه خوزستانی شناسایی شده است. مقایسه نتیجه‌های کروماتوگرام به دست آمده از HPLC-UV بین عصاره تام و غنی شده در این پژوهش نشان دهنده غنی سازی ترکیبات پلی فنلی و افزایش مقادیر آنها در عصاره مورد استفاده برای مرحله فرمولاسیون می‌باشد [۲۴]. ماده شاخص موجود در عصاره مرزه خوزستانی ترکیب رزمارینیک اسید هست که به وسیله ثبت طیف جرمی به کمک دستگاه LC-MS شناسایی شد. طیف ماورای بنفش این ترکیب و جرم ملکولی ۳۵۹ که نشانگر یونیزاسیون این ماده در حالت منفی و کنده شدن یک پروتون [M-H] از ساختار می‌باشد. نتیجه‌های فوق با اطلاعات به دست آمده از فاطمی و همکاران مطابقت داشت [۲۵]. از طرفی دیگر با در نظر گرفتن تحقیقات اخیر در زمینه شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی بر پایه فنلی، و با در نظر گرفتن پتانسیل مرزه خوزستانی از نظر وجود مواد فعال پلی فنلی، بهبود روش‌های گوناگون دارورسانی بر روی مرزه خوزستانی مورد توجه محققان قرار گرفته است. به عنوان مثال مزارعی و همکاران از اسانس مرزه خوزستانی به منظور ساخت نانوامولسیون با ویژگی‌های باکتریایی استفاده کردند [۲۶]. در پژوهشی دیگر عصاره گیاه مرزه خوزستانی به عنوان منبع گیاهی در ساختار نانو ذره‌های مس مورد بهره‌برداری قرار گرفت [۱۳]. در این میان، فیتوزم نیز به عنوان روشی جدید در صنعت غذایی و دارویی جهان شناخته شده است و مقالات بسیاری در این خصوص به چاپ رسیده است [۲۷]. با بهره‌گیری از ویژگی سازگاری فیتوزم (پوشش فسفولیپیدی) و برهمکنش مناسب با ترکیبات فعال گیاهی [۲۸] و همچنین با در نظر گرفتن فقدان پژوهش علمی مبنی بر استفاده از عصاره پلی فنلی غنی شده از مرزه خوزستانی در ساخت نانوفیتوزم به طور قطع می‌توان فرم دارویی ایجاد شده را به عنوان پوشش مناسب و موثر به منظور کاهش آسیب پذیری ترکیبات طبیعی و افزایش زیست فراهمی این مواد معرفی کرد. ترکیبات طبیعی بسیاری با استفاده از تشکیل ذره‌های نانوفیتوزم‌ها به‌عنوان پوشش مناسب در صنایع دارویی و غذایی استفاده شده است. فیتوزم کوئرستین با اندازه ذره ۷۰ نانومتر به عنوان پوشش مناسب در درمان تخمدان آسیب دیده موش صحرایی استفاده شد [۲۹]. ذره‌های فیتوزم گزارش شده در صنایع دارویی و غذایی دارای اندازه ذره کمتر ۱۰۰ نانومتر می‌باشد که به طور کامل با داده‌های به دست آمده در این تحقیق با میانگین اندازه ذره‌ها ۸۲/۲ در این مطالعه همخوانی دارد. در پژوهشی دیگر، نانوفیتوزم کوئرستین به عنوان ماده اصلی مکمل غذایی فرموله و در فرم مکمل مورد استفاده قرار گرفت [۲۸]. ساختار فوق در تحقیقاتی دیگر به عنوان پوششی



شکل ۵: زمان و مکانیسم رهائش ذره‌های تشکیل شده فیتوزم حاوی عصاره غنی شده پلی فنلی مرزه خوزستانی، منحنی رها شدن عصاره غنی شده پلی فنلی مرزه خوزستانی با سه تکرار در فواصل زمانی معین (الف)، میانگین رهاسازی عصاره غنی شده پلی فنلی مرزه خوزستانی (ب)، مکانیسم رهاسازی ترکیبات پلی فنلی عصاره مرزه خوزستانی تفسیر شده توسط مکانیسم Korsmeyer (ج)

با این حال زیست فراهمی پایین و تخریب ترکیبات طبیعی در محیط‌های زیستی از مشکلات بزرگ استفاده از آنها می‌باشد. در این بین مرزه خوزستانی منبع غنی از ترکیبات فعال زیستی که باعث بهبود وتقویت بدن در برابر بیماری‌های مزمن، بخصوص سرطان‌ها می‌شود [۲۳]. مواد فعال زیستی بسیاری با منشا ساختاری پلی فنلی



برابری نسبت به عصاره تام معرفی کرد. همچنین به طور قطع پوشش فسفولیپیدی ساختار فیتوزم با اندازه ذره‌ای موثر ۸۲/۲ نانومتر و زمان رهایش ۴/۸۳۳ دقیقه در آب مقطر توسط روش تشکیل لایه نازک و امواج مافوق صوت با شدت بالا و خشک کردن با دستگاه خشک کن انجمادی و پایداری ۶ ماه به عنوان روشی سریع، ارزان، با اثر پذیری بالا و خطر پذیری کم در افزایش زیست فراهمی و پایداری عصاره پلی‌فنلی مرزه خوزستانی در نظر گرفت.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید بهشتی به دلیل حمایت‌های مالی کمال تشکر و قدردانی را دارند. از حمایت‌های مالی و فکری شرکت داروسازی گیاهی وشا دارو پارس در جهت پیشنهاد ایده اولیه کار و تامین ماده گیاهی کمال تشکر و قدردانی صورت می‌گیرد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۳

مناسب ماده فعال و موثر در درمان بیماری‌های پوستی مورد بررسی قرار گرفت [۳۰]. سرانجام رهایش مواد فعال از پوشش فسفولیپیدی با پیروی از مدل Korsmeyer و بررسی پارامتر  $n$  و شتاب رهایش از رابطه  $t^{0.57}$  بررسی شد. سرانجام ضریب همبستگی معادل ۰/۹۹۰۶ و پارامتر  $n$  معادل ۰/۳۵۳۵ در نتیجه رهایش از مکانیسم انتشار فیکان (انتقال فاز I) تعریف می‌شود. مکانیسم رهایش مدل Korsmeyer در مطالعات متعددی به عنوان مدل رهایش مناسب نانو ذره‌های مورد استفاده و آنالیز قرار گرفته است [۳۱]. همچنین مدل Korsmeyer به عنوان مدل قطعی تفسیر مکانیسم رهاسازی نانو ذره‌ها با پوشش فسفولیپیدی یا پلیمری انتخاب شده است [۲۱]. سرانجام با توجه به قطعیت مدل Korsmeyer در تفسیر رهایش ترکیبات فعال از نانو ذره‌ها، مدل ریاضیاتی فوق در مطالعه فوق انجام و با قطعیت بالا گزارش شد.

### نتیجه گیری

با توجه به نتیجه‌های تجربی به دست آمده از غنی‌سازی ترکیبات پلی‌فنلی توسط رزین جذبی Diaion HP-20، روش فوق به عنوان روشی موفق که منجر به افزایش مقدار ترکیبات پلی‌فنلی معادل ۱/۷۱

### مراجع

- [1] Shahabi J., Akbarzadeh A., Heydari Nasab A., Arjmand M., [Doxorubicin Loaded Liposomal Nanoparticles Containing Quantum Dot for Treatment of Breast Cancer](#), *Iran. J. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **38(5)**: 45–53 (2019).
- [2] Burey P., Bhandari B. R., Howes T., Gidley M. J., [Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application](#), *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, **48(5)**: 361–377 (2008).
- [3] Nedovic V., Kalusevic A., Manojlovic V., Levic S., Bugarski B., [An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications](#), *Procedia Food Sc.*, **1**: 1806–1815 (2011).
- [4] Dewan N., Dasgupta D., Pandit S., Ahmed P., [Review on- Herbosomes, A New Arena for Drug Delivery](#), *J. Pharmacogn. Phytochem*, **5(4)**: 104–108 (2016).
- [5] Bhingardev D., Patil S., Patil R., Patil S., [Phytosome- Valuable Phyto-Phospholipid Carriers](#), *J. Curr. Phrama Res*, **5(1)**: 7842 (2014).
- [6] Duarte, J., Pérez-Vizcaíno, F., Zarzuelo A., Jiménez J., Tamargo J., [Vasodilator Effects of Quercetin in Isolated Rat Vascular Smooth Muscle](#), *Eur. J. Pharmacol*, **239(1993)**: 1–7 (2000).
- [7] Patel J., Patel R., Khambholja K., Patel N., [An Overview of Phytosomes as an Advanced Herbal Drug Delivery System](#), *Asian J. Pharm. Sci*, **4(6)**: 363–371 (2009).
- [8] Kidd P.M., [Bioavailability and Activity of PHytosome Complexes from Botanical Polyphenols: The Silymarin, Curcumin, Green Tea, and Grape Seed Extracts](#), *Altern. Med. Rev*, **14(3)**: 226–46 (2009)

- [9] Parris K., Kathleen Head, ND., [A Review of the Bioavailability and Clinical Efficacy of Milk Thistle Phytosome: A Silybin-Phosphatidylcholine Complex](#), *Alternative Medicine Review*, **10(3)**: 193-203 (2005).
- [10] A. Gandhi, A. Dutta, A. Pal, P. Bakshi, [“Recent Trends of Phytosomes for Delivering Herbal Extract with Improved Bioavailability](#), *J. Pharmacogn. Phytochem*, **1(4)**: 6–14 (2012).
- [11] Young-Hee C., Shin Dong-Suck S., [Optimization of Emulsification and Spray Drying Process for the Microencapsulation of Flavor Compounds](#), *Korean J. Food Sci*, **32(1)**: 132–139 (2000).
- [12] Mazarei Z., Rafati H., [Nanoemulsification of \*Satureja Khuzestanica\* Essential Oil and Pure Carvacrol; Comparison of Physicochemical Properties and Antimicrobial Activity Against Food Pathogens](#), *Lwt*, **100**: 328–334 (2019).
- [13] Hasheminya S. M., Mokarram R. R., Ghanbarzadeh B., Hamishekar H., Kafil H. S., Dehghannya J., [Influence of Simultaneous Application of Copper Oxide Nanoparticles and \*Satureja Khuzestanica\* Essential Oil on Properties of Kefiran–Carboxymethyl Cellulose Films](#), *Polym. Test*, **73**: 377–388 (2019).
- [14] Jafari F., Ghavidel F., Zarshenas M. M., [A Critical Overview on the Pharmacological and Clinical Aspects of Popular \*Satureja\* Species](#), *JAMS J. Acupunct. Meridian Stud*, **9(3)**: 118–127 (2016).
- [15] Siavash Saei-Dehkordi S., Fallah A. A., Heidari-Nasirabadi M., Moradi M., [Chemical Composition, Antioxidative Capacity and Interactive Antimicrobial Potency of \*Satureja Khuzestanica\* Jamzad Essential Oil and Antimicrobial Agents Against Selected Food-Related Microorganisms](#), *Int. J. Food Sci. Technol*, **47(8)**: 1579–1585 (2012).
- [16] Giannouli E., Athanasopoulos D., Panagopoulos G., Tsiara S., Karageorgiou C. E., [Paraneoplastic Syndromes Associated with Merkel Cell Carcinoma: A Case Series of Eight Patients Highlighting Different Clinical Manifestations](#), *J. Am. Acad. Dermatol.*, **75(3)**: 541–547 (2016).
- [17] Jung-won M., Dong-jin P., Kwang H E E S., Ki-hong Y., Hae-ryong, P., Young-soo P., Mu-gil K., Jung-min L., Chang-jin K., [“Large-Scale Fermentation for the Production of Teicoplanin from a Mutant of \*Actinoplanes Teichomyceticus\*](#), *J. Microbiol. Biotechnol*, **15(4)**: 787–791 (2005).
- [18] Brochure P. L., [“Mitsubishi-DIAION-Resin-Lenntech”](#), Mitsubishi Chem, (2013).
- [19] Fei Yu., Yang Li., Qin C., Yuan H., Huiyun W., Liu Y., Shangjing G., Zhaohui M., Jinghao C., Mei X., Xiao D C., [Monodisperse Microparticles Loaded with the self-Assembled Berberine-Phospholipid Complex-Based Phytosomes for Improving Oral Bioavailability and Enhancing Hypoglycemic Efficiency](#), *Eur. J. Pharm. Biopharm*, **103**: 136–148 (2016).
- [20] Anwar E., Farhana N., [Formulation and Evaluation of Phytosome-Loaded Maltodextrin-Gum Arabic Microsphere System for Delivery of \*Camellia Sinensis\* Extract](#), *J. Young Pharma*, **10(2s)**: 56-S62 (2018).
- [21] Permanadewi I., Kumoro A. C., Wardhani D. H., Aryanti N., [Modelling of Controlled Drug Release in Gastrointestinal Tract Simulation](#), *J. Phys. Conf. Ser*, **1295**: 1 (2019).
- [22] Siepmann J., Siegel R. A., Rathbone M. J., [Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery](#), *Adv. Deliv. Sci*. **15(2)**: 19-43 (2012).

- [23] Hadian J., Mirjalili M. H., Kanani M. R., Salehnia A., Ganjipoor P., **Phytochemical and Morphological Characterization of *Satureja Khuzistanica* J Amzad Populations from Iran**, *Chem. Biodivers*, **8(5)**: 902–915 (2011).
- [24] Davoodi M., Rustaiyan A., Ebrahimi S. N., **Monoterpene Flavonoid from Aerial Parts Of *Satureja Khuzistanica***, *Rec. Nat. Prod*, **12( 2)**: 175–178, (2017).
- [25] Fatemi F., Abdollahi M. R., Mirzaie-asl A., Dastan D., Garagounis C., Papadopoulou K., **“Identification and Expression Profiling of Rosmarinic Acid Biosynthetic Genes from *Satureja Khuzistanica* Under Carbon Nanotubes and Methyl Jasmonate Elicitation,”** *Plant Cell. Tissue Organ Cult*, **136(3)**: 561–573, (2019).
- [26] Mazarei Z., Rafati H., **Nanoemulsification of *Satureja khuzestanica* Essential Oil and Pure Carvacrol; Comparison of Physicochemical Properties and Antimicrobial Activity Against Food Pathogens**, *Lwt*, **100**: 328–334, (2019).
- [27] Maryana W., Rachmawati H., Mudhakhir D., **Formation of Phytosome Containing Silymarin Using Thin Layer-Hydration Technique Aimed for Oral Delivery**, *Mater. Today Proc*, **3(3)**: 855–866 (2016).
- [28] Antonella R., Jacopo A. V., Gianni B., Shu H., Beatrice F., Giulia V., Marisa V., Ezio B., Luca G., Roberto E., Stefano T., **Quercetin Phytosome® in Triathlon Athletes: A Pilot Registry Study**, *Minerva Med*, **109(4)**: 285–289 (2018).
- [29] Abd El-Fattah A. I., Fathy M. M., Ali Z. Y., El-Garawany A. E.-R. A., Mohamed E. K., **Enhanced Therapeutic Benefit of Quercetin-Loaded Phytosome Nanoparticles in Ovariectomized Rats**, *Chem. Biol. Interact*, **271**: 30–38 (2017).
- [30] Giada M., Stefano T., Ivan P., Luca G., Roberta C., Samuele B., Roberto E., **Soothing and Anti-Itch Effect of Quercetin Phytosome in Human Subjects: A Single-Blind Study**, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol*, **26(9)**: 55-62 (2016).
- [31] Wojcik-Pastuszka D., Krzak J., Macikowski B., Berkowski R., Osiński B., Musiał W., **Evaluation of the Release Kinetics of a Pharmacologically Active Substance from Model Intra-Articular Implants Replacing the Cruciate Ligaments of the Knee**, *Materials (Basel)*, **12(8)**: 1-13 (2019).